

A kutatás célja, a munkatervben vállalt kutatási program ismertetése

A kutatás célja, hogy eredményes vitrifikációs módszereket fejlesszen ki a különböző fajtájú sertés petesejtek, valamint embriók mélyhűtésére. Mivel a sertés faj esetében eltérések tapasztalhatók a különböző fajták hűhetőségével kapcsolatban fontos a Magyarországon jelentős és az őshonos fajták petesejtjeinek és embrióinak hűtésére alkalmas módszerek kifejlesztése. Először in vitro maturáltatás alatt vizsgáltuk különböző növekedési faktorok közül az idegi növekedési faktor hatását a maturáció előrehaladására, valamint az embrió fejlődésre. Fontosnak tartottuk a különböző érettségű petesejtek vitrifikációs hűhetőségének vizsgálatát. Ehhez kapcsolódóan vizsgáltuk a sertés petesejtek kémiai aktiválhatóságát. A herceghalmi ÁTK kutatóinak segítségével in vivo előállított embriók vitrifikációs hűtését kíséreltük meg. A mangalica és nagy fehér sertés petesejtek különböző vitrifikációs módszerekkel történő hűtése után vizsgáltuk a fertilizáció utáni embriófejlődést.

A tárgykörben alkalmazott módszerek, eljárások

Az éretlen petesejteket 2-6mm átmérőjű vágóhídi állatok petefészkéből nyert tüszőkből gyűjtöttük össze. A petesejteket in vitro maturáltattuk 48 óráig 39 °C-on, 5 % CO₂ tartalmú gázkeverékben. Kísérleteinkben felhasznált vegyszereket a Sigma Aldrich Chemical Co (Budapest, Hungary)-tól rendeltük. A petesejtek gyűjtéséhez TL- Hepes oldatot használtunk.

A maturációs oldat TCM 199 (M-7528) volt, amit 10 % sertés tüszőfolyadékkal, 1,25 mM L- glutaminnal (G-3126), 0,9 mM Na- piruváttal (S-3362), 100 µM ciszteaminnal (M-9768), 0,1 mg/ml sztreptomycin- szulfáttal, 10 IU/ml PMSG-vel (Werft- Chemie GmbH), és 10 IU/ml hCG-vel (Werft- Chemie GmbH) egészítettük ki.

A petesejtek/embriók fejlettségének megállapításához a petesejteket/embriókat egy fedőlemez segítségével tárgylemezhez rögzítettük, majd legalább 3 napon át ecetsav és alkohol 1: 3 arányú keverékében fixáltuk. A fixálást követően a petesejteket/embriókat 1%-os ecetsavas orceinnel megfestettük 200 és 400× nagyításon fázis-kontraszt mikroszkóppal (Leica) vizsgáltuk.

A termékenyítéshez Tris Buffer Mediumot (mTBM) használtunk, ami a következő komponensekből állt: 113,1 mM NaCl (S 5886), 3 mM KCl (P 5405), 7,5 mM CaCl₂ x 2H₂O (C 7902); 20 mM Tris (T 1410); 11 mM glükóz (G 6152); 5 mM nátrium- piruvát (P 2256); 0,1% BSA (A 8022) és 1mM koffein (C 0750).

A fertilizációhoz 0.25ml-es műszalmákban mélyhűtött ejakulált kanspermát használtunk. A műszalmákat párosával 37 °C-os vízfürdőben egy percen belül felolvasztottuk majd azok tartalmát centrifuga csőbe, 8 ml előinkubált fertilizációs médiumba helyeztük és két percen át 2000g/perc fordulatszámon centrifugáltuk. A centrifugálással kapott pelletet 70 µl előinkubált fertilizációs médiumban homogenizáltuk, majd a szuszpenzió koncentrációját Thoma sejtszámláló kamra segítségével meghatároztuk és a kapacitáció elősegítése érdekében 15 percen át inkubáltuk. A termékenyítéshez használt spermiumok koncentrációja milliliterenként 1×10^5 volt. A petesejteket a spermiumokkal mindössze 3 órán át inkubáltuk együtt – ez elegendő idő a termékenyüléshez.

Ezt követően a petesejteket (zigótákat) NCSU 23 tápközegeben, 0,4 % BSA kiegészítés mellett, hat napon át 39°C-on, 5% CO₂ tartalmú légtérben inkubáltuk.

Az OPS (open pulled straw) vitrifikációt Vajta és mts módszere szerint (Mol. Rep. Dev. 1998, 51. 53-58) alapján végeztük. Krioprotektánsnak etilén glikolt és dimetil-szulfoxidot használtunk. A felolvasztás is több lépcsőben történt. Az alkalmazott médium alapja hepes TCM és 0,13 M szukróz (S 1888) volt, amit kiegészítettünk a következő vegyszerekkel: L-

glutamin (200 m/M 0.34 ml), + NBCS (10 ml), glutamin (1.36 ml), újszülött szérumalbumin (20 %).

Az utolsó kísérletsorozatban alkalmazott különböző vitrifikációs eljárásoknál: az oldatok végkoncentrációja OPS 1 -nél 3 M dimetil-szulfoxid (D 2650) és 3 M etilén-glikol (E 4378), OPS 2-nél pedig 6 M DMSO és 6 M EG.

Első kísérletsorozat

Az idegi növekedési faktor 1 ng/ml koncentrációjának hatását vizsgáltuk a sejtmagi érése és az in vitro fertilizációt követő embriófejlődésre

Második kísérletsorozat:

Következő kísérleteinkben vizsgáltuk a kumulusz réteggel körülvett illetve kumulusz sejtek nélküli éretlen petesejtek túlélő képességét a vitrifikációt és visszaolvasztást követően.

Harmadik kísérletsorozat:

A sertés petesejtek kémiai aktiválhatóságát vizsgáltuk olyan módon, hogy egyrészt összehasonlítottuk a stroncium-klorid (S) sertés petesejt aktiváló és partenogenetikus fejlődést elősegítő képességét a cikloheximiddel (CX) és a 6-dimetilaminopurinnal (D) összehasonlítva, másrészt igazoljuk, hogy a két kezelés kombinációja milyen hatással van az aktivációra és az embriófejlődésre.

Negyedik kísérletsorozat:

In vivo termelt mangalica embriók beültetése

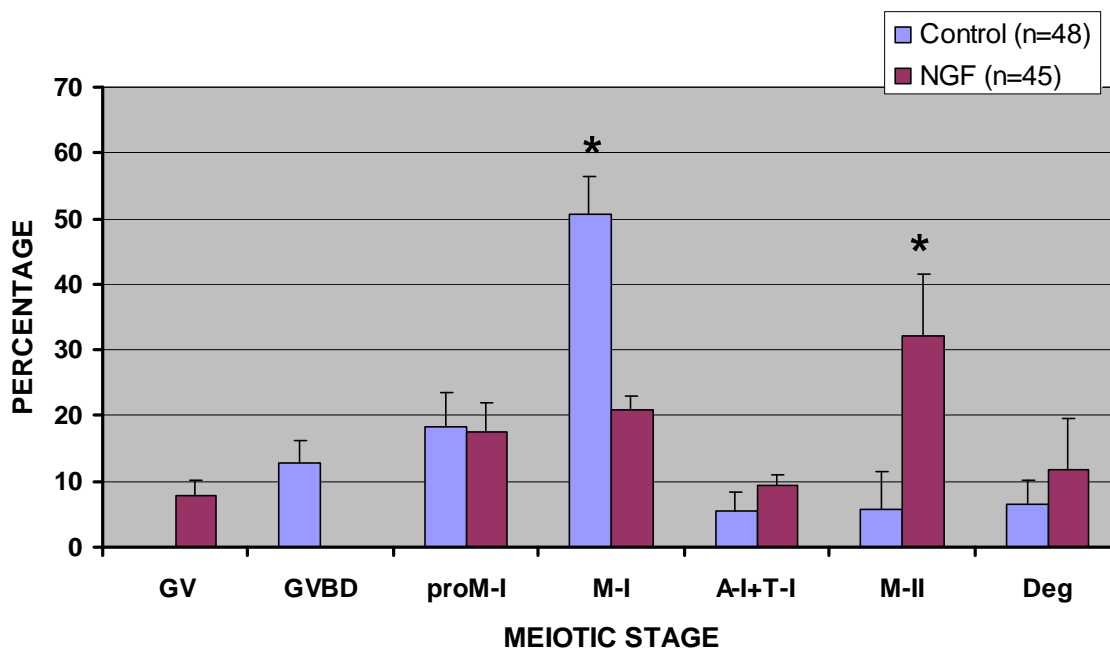
Ötödik kísérletsorozat:

Ezután elvégeztük a magyar nagyfehér és mangalica petesejtek különböző módszerekkel történő vitrifikációs hűtésének és a visszaolvasztást követő fertilizáció utáni embriófejlődés összehasonlítását.

Az elért eredmények és értékelésük

Első kísérletsorozat:

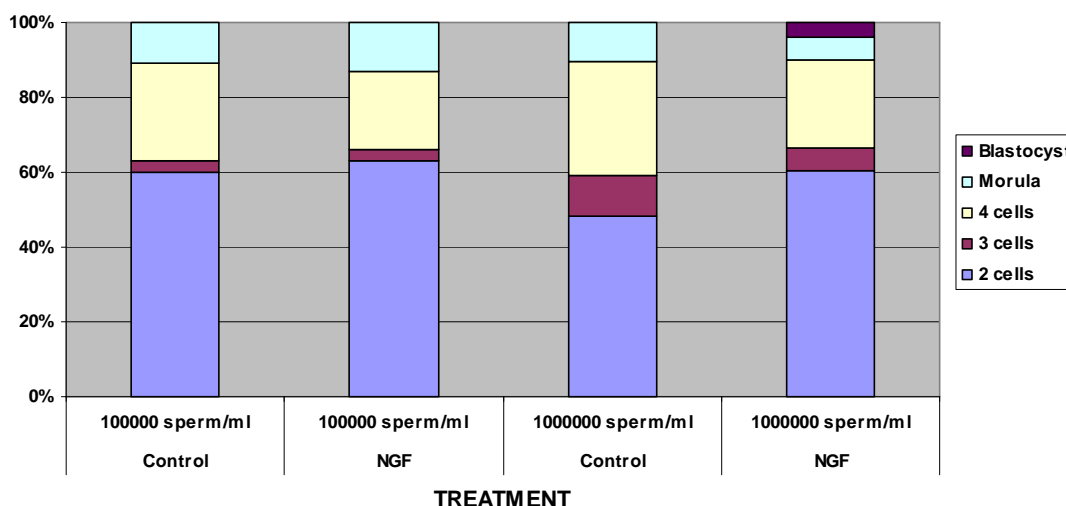
Az idegi növekedési faktor 1 ng/ml koncentrációjának hatását vizsgáltuk a sejtmagi érése és az in vitro fertilizációt követő embriófejlődésre



1. ábra. A sejtmag állapota 30 óra maturáltatás után

A sejtmagi érés állapotában szignifikáns különbség volt tapasztalható 30 óra petesejt kultiválás után az NGF és kontroll csoport között. Erre az időpontra szignifikánsan több petesejt érte el az érett M-II. állapotot az NGF csoportban, mint a kontrollban ($32,0 \pm 9,6\%$ és $5,7 \pm 5,7\%$). A maturáltatás 30. órájában azok a petesejtek, melyeket NGF hiányában kultiváltattunk főleg a sejtmagi érés M-I. stádiumában ($50,7 \pm 8,1\%$) voltak és csak kevés oocita érte el az anafázis I.+ telofázis I. állapotot ($5,5 \pm 2,9\%$). Azoknak a petesejteknek az aránya, melyek a prometafázis I. állapotban voltak hasonló volt mindkét csoportban ($17,6 \pm 1,6\%$ és $18,4 \pm 2,4\%$). A degenerált petesejtek aránya hasonló volt mindkét csoportban

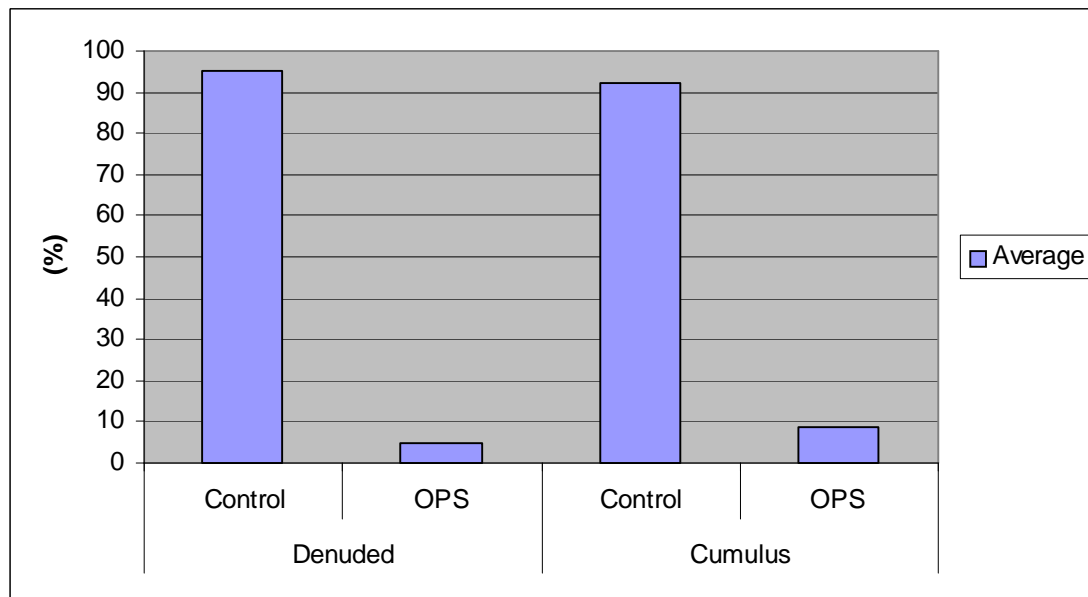
A maturáltatás alatti NGF kezelés nem volt hatással az embriók osztódására és a fragmentáció arányára. Az osztódott embriók közel fele 2 sejtes állapotban rekedt, attól függetlenül, hogy a kultivációs médium tartalmazott-e NGF-et vagy nem, és az embriók elég jelentős része 3-4 sejtes állapotban volt mindkét csoportban. A morula állapotú embriók aránya 10,2 % volt a kontroll csoportban és közel ennyi volt a kezelt csoportban is. Az NGF csoportban az embriók egy nagyon kis mennyisége elérte a blasztociszta állapotot, míg a kontroll csoportban ilyen mértékű embrió fejlődés nem volt tapasztalható



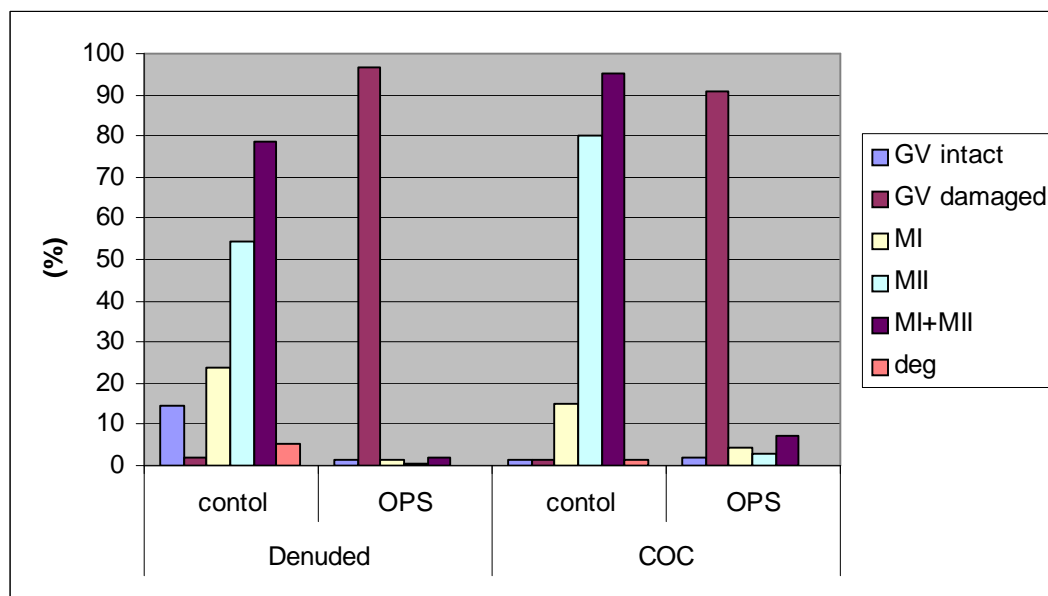
2. ábra. Az osztódott embriók állapota 6. napos kultiválás után

Második kísérletsorozat:

Kísérleteinkben vizsgáltuk a kumulusz réteggel körülvett illetve kumulusz sejtek nélküli éretlen petesejtek túlélő képességét. Közvetlenül a petesejt gyűjtés után minden petesejt germinális vezikulum (GV) állapotban volt, intakt GV membránnal. A vitrifikáció után szignifikánsan kevesebb petesejt rendelkezett normál morfológiával (intakt plazmamembrán) mind a kumulusz sejt nélküli, mind a kumulusz sejtes csoportban (4,7% és 8,5%) mind a fagyasztás nélküli kontrolnál (95,0% és 92,0%).



3. ábra. A normál morfológiával rendelkező petesejtek aránya a vitrifikáció után



4. ábra. A petesejtek sejtmagi állapota az in vitro érlelés után

Az in vitro maturáltatás után, a COC petesejtek közül többenél következett be a sejtmembrán feloldódás, mint a kumulusz sejtek nélküli kontrollban (95,0% és 78,2%) és a metafázis II. állapotú petesejtek aránya is magasabb volt a COC sejtek között, mint a kumulusz sejtek nélküli kontrollban (80,0% és 54,5%). A vitrifikáció szignifikánsan csökkentette azon petesejtek arányát, melyben végbement a magfeloldódás folyamata (2,0 és 7,0%) és azokat is, melyekben végbement a metafázisos 2. osztódás (0,6% és 2,8%). A legtöbb vitrifikált oocita germinális vezikuluma sérült volt, mely membrán sérülésekben, a kromatin állomány összezsapódott vagy szétszóródott elhelyezkedésében nyilvánult meg mind a kumulusz sejtes mind az anélkül érlelt petesejtekben (90,7 és 96,4%).

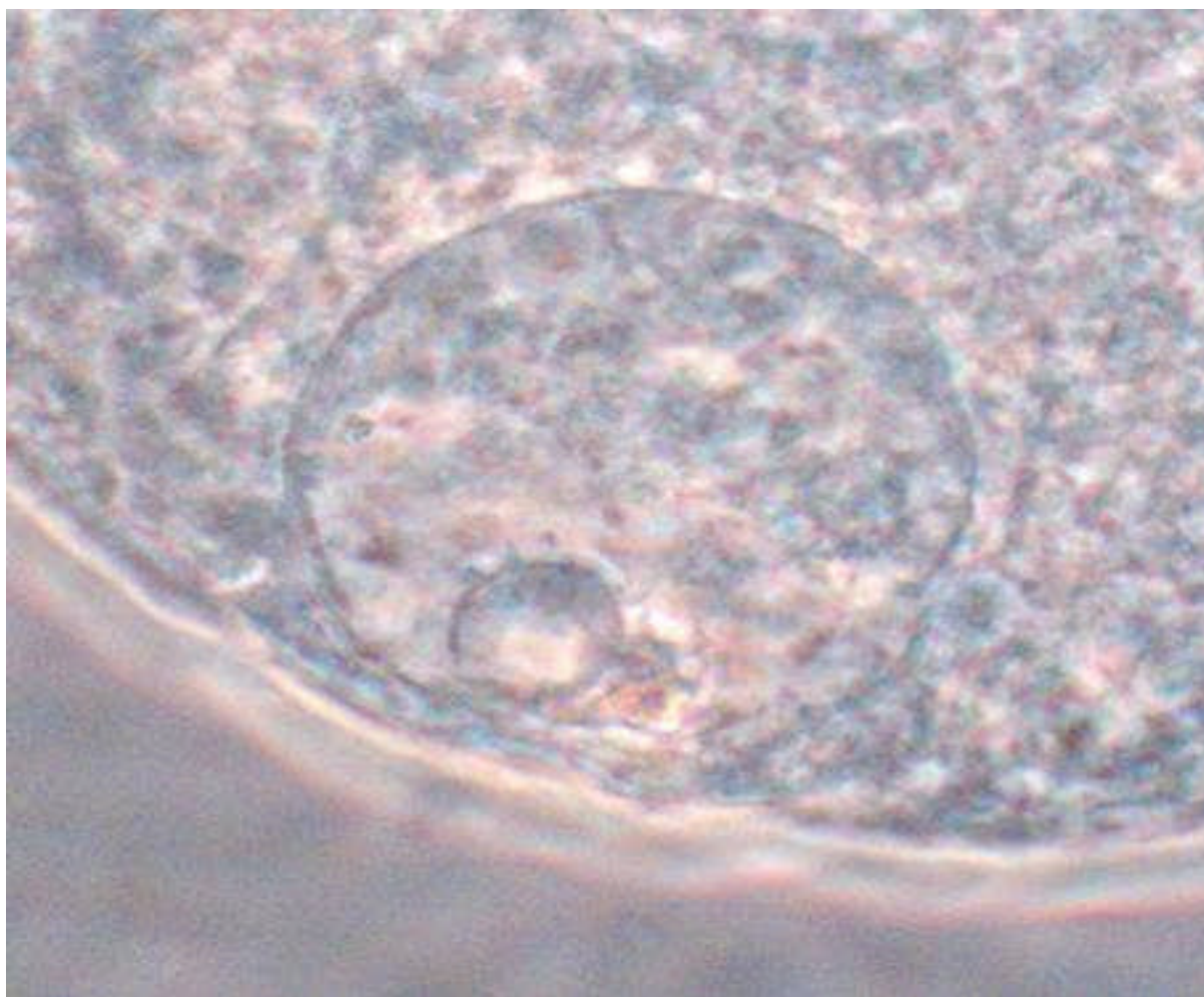
Ezek az adatok azt mutatják, hogy a kumulusz sejtekkel körülvett petesejtek eredményesebben vitrifikálhatók, mert a kumulusz sejtek segítségével könnyebben folytatódik bennük a meiosis folyamata, mint azokban a petesejtekben melyekhez nem kapcsolódtak kumulusz sejtek.

További kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy a vitrifikációs eljárás hogyan hat a kumuluszsejtekkel körülvett és a lecsupaszított petesejtek termékenyülésére (2. kísérlet) és megfigyeltük, hogy a vitrifikációs eljárás hogyan befolyásolja az éretlen és az érett petesejtek in vitro fejlődését és termékenyülését (3. kísérlet).

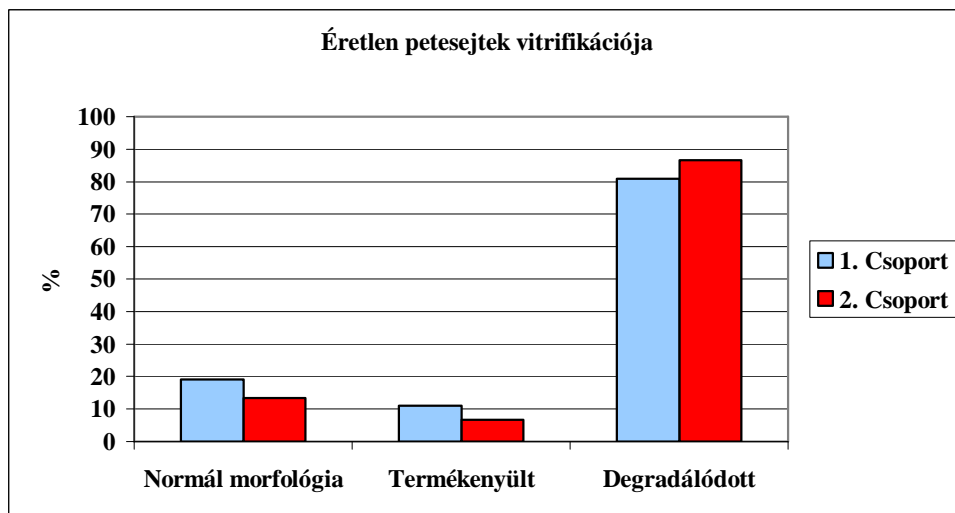
1. táblázat. Kísérleti csoportok az alkalmazott módszer és a petesejtek morfológiai állapota alapján

	Petesejtek morfológiai állapota	Alkalmazott módszer
1. csoport	COC	Vitrifikáció- IVM-IVF-IVC
2. csoport	Csupasz	Vitrifikáció- IVM-IVF-IVC
3. csoport	COC	IVM- vitrifikáció- IVF-IVC
4. csoport	Csupasz	IVM- vitrifikáció- IVF-IVC

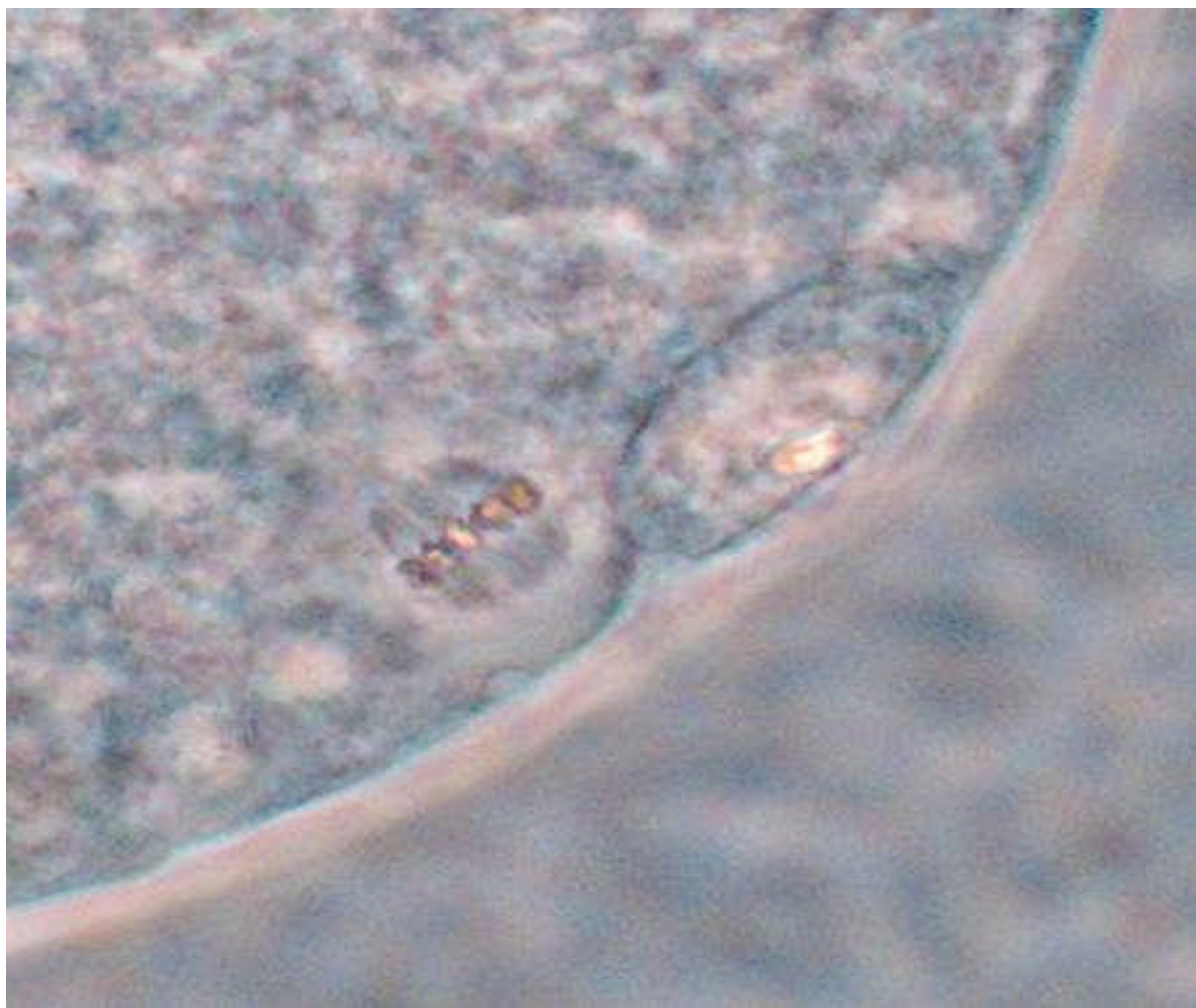
A következő kísérletben megvizsgáltuk, hogy a vitrifikációs eljárás hogyan befolyásolja az érett és éretlen petesejtek morfológiáját és termékenyülését.



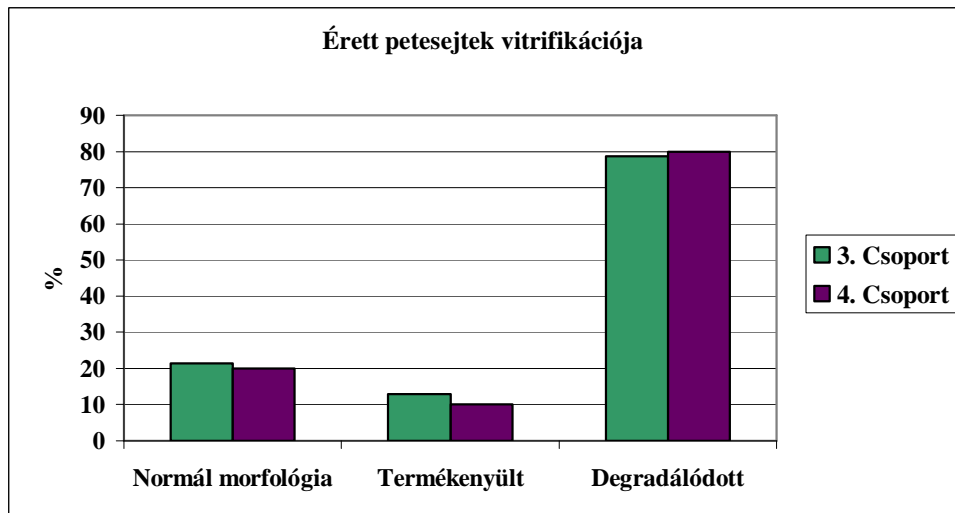
5. ábra. GV állapotú petesejt vitrifikáció előtt (400x nagyítás)



6. ábra. **Éretlen (germinális vezikulum állapotában lévő) petesejtek vitrifikációja**

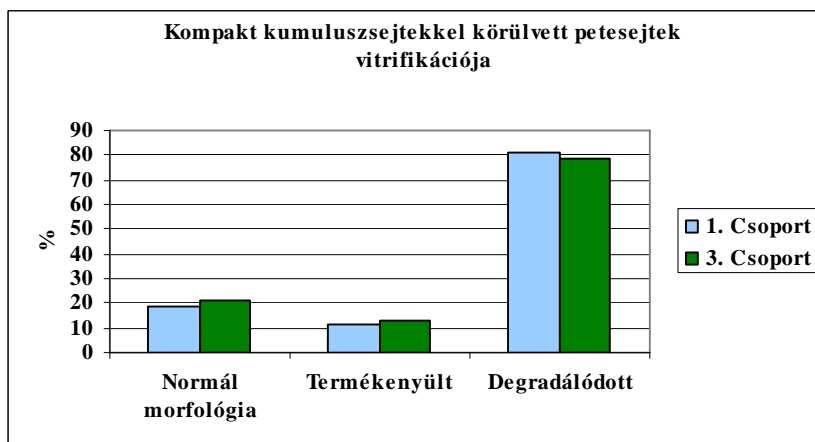


7. ábra. **Érett petesejt (MII állapot) vitrifikáció előtt (400x nagyítás)**

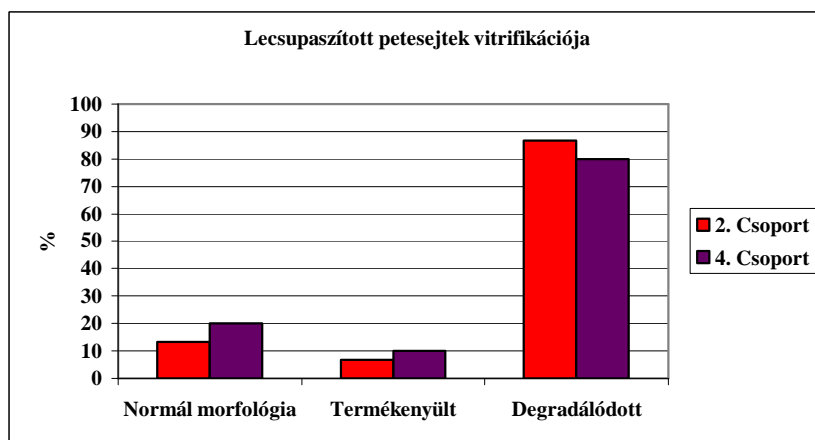


8. ábra. **Érett (metafázis II állapotú) petesejtek vitrifikációja**

Megvizsgáltuk, hogy a vitrifikáció hogyan befolyásolja a kompakt kumulussejtekkel körülvett (1, 3. csoport) és a lecsupaszított petesejtek (2, 4. csoport) termékenyülését.



9. ábra. **Kumulus sejtekkel körülvett petesejtek (COC) vitrifikációja**



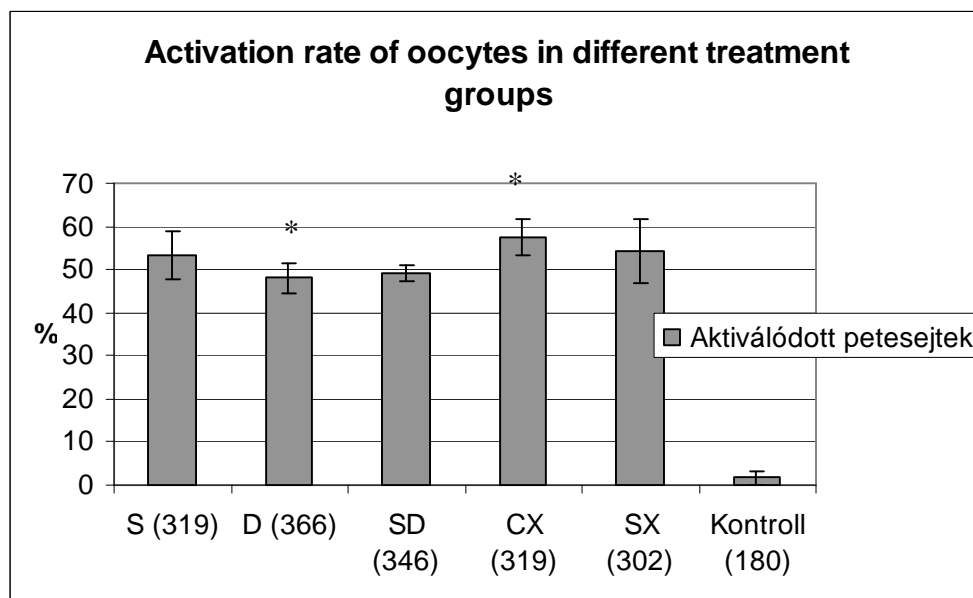
10. ábra. **Lecsupaszított petesejtek vitrifikációja**

A vitrifikációs eljárás során a petesejtek nagy része degradálódott (1. csoport 81,0%, 2. csoport 86,7%, 3. csoport 78,6 %, 4. csoport 80%). Megállapítható azonban, hogy a kumulusszal körülvett petesejtekben nagyobb a normál morfológiájú petesejtek aránya, mint a csupasz petesejtek esetében. A maturáció illetve a vitrifikáció sorrendje és a sejtek morfológiai állapota között nem találtunk összefüggést.

A kísérletek során a petesejteknek kevesebb, mint 13,0 %-a termékenyült. A legnagyobb termékenyülési százalék a 3. csoportban (COC) volt, 12,9%.

3. kísérletsorozat:

Először összehasonlítottuk a cikloheximid(CX), a 6-dimetilaminopurin(D) és stroncium-klorid(S) hatását a petesejt aktiválásra és embriófejlődésre. Az aktiválódás mértékét a petesejt pronukleusz képző hatása alapján állapítottuk meg. A következő kísérletben összehasonlítottuk a stronciumklorid (S) a stroncium-klorid és cikloheximid (SX) és a stroncium-klorid és a 6-dimetilaminopurin (SD) hatását az in vitro érlelt petesejtek aktiválására.



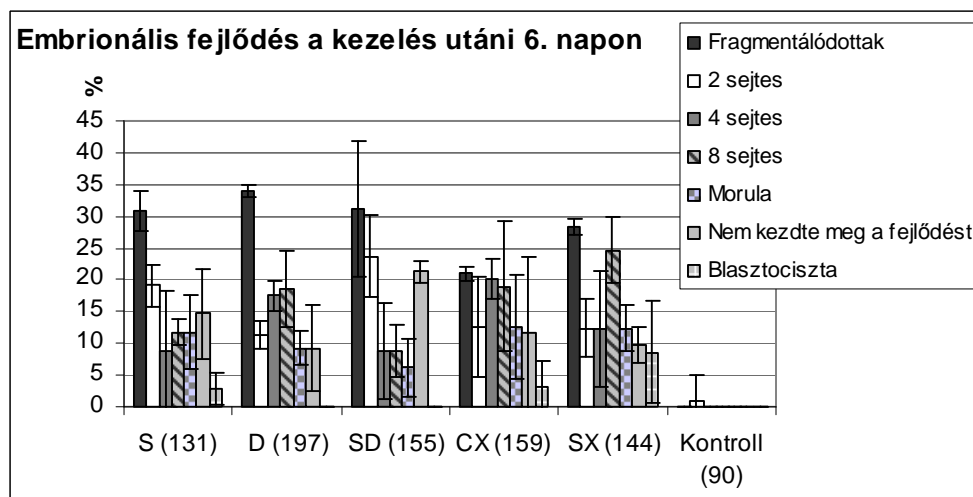
11. ábra. Különböző kémiai aktiválás hatására különböző fejlettséget elérő petesejtek:

Mindegyik csoportban a petesejtek több, mint 45 %-a aktiválódott.

Az aktiválódás a különböző csoportokban a következőképpen alakult: S – 53,29±5,39%, D- 48,09±3,43%, SD-49,13±3,89 %, CX - 57,37±4,21%, SX – 54,3 ±7,29, kontroll-1,67 ±1,67%.

Az aktivációs ráta a CX csoportban (57,37±4,21%) szignifikánsan nagyobb volt ($P < 0,05$) szinten, mint a D csoport (48,09±3,43%).

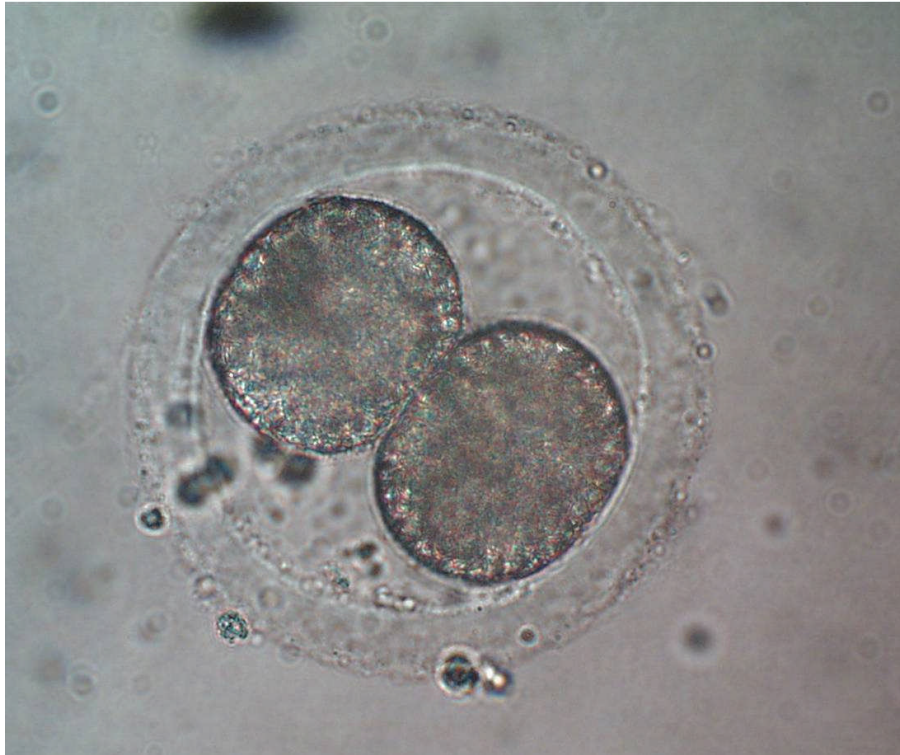
A többi csoport között nem találtunk szignifikáns különbségeket.



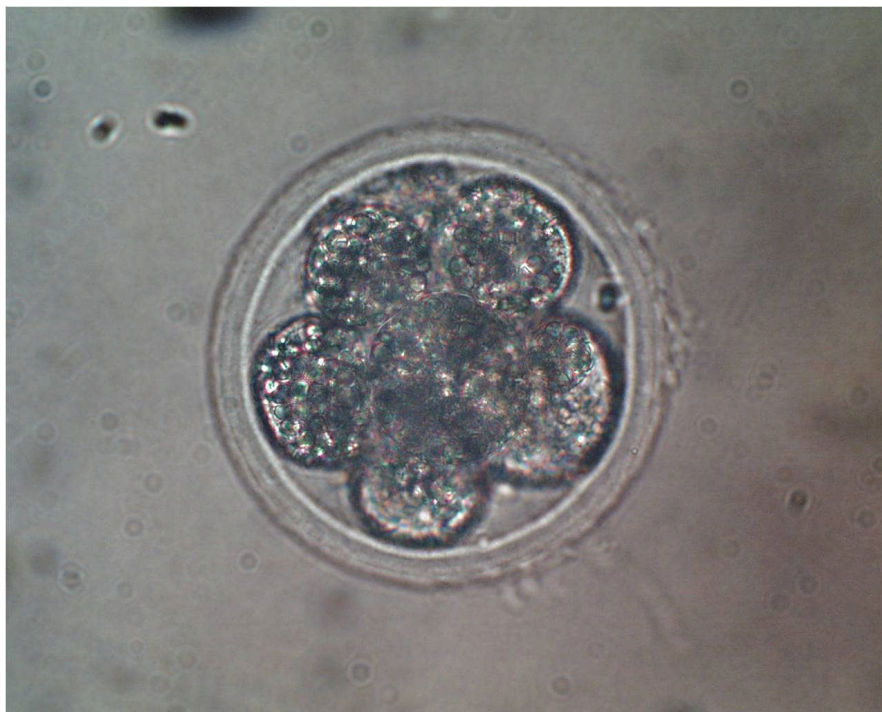
12. ábra. Embrionális fejlődés a kezelést követő 6. napon

6 napos kultiválás utáni eredményeink a következők:

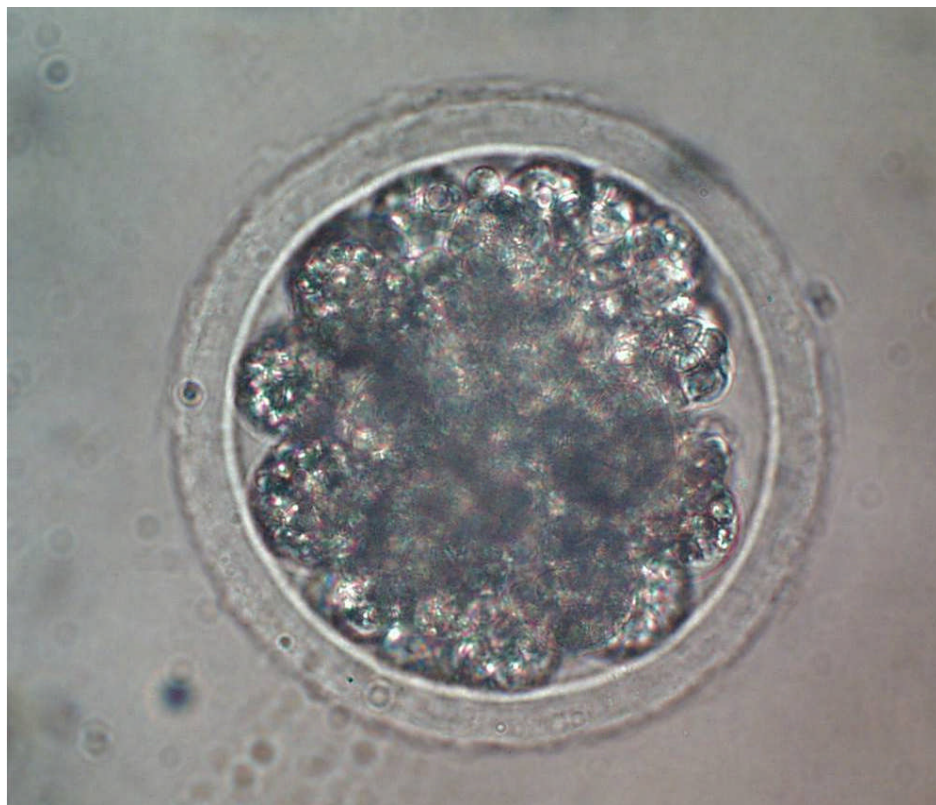
- Nem kezdte meg az embrionális fejlődést S-14,71±7,02%, D – 9,28±6,85%, SD – 21,25±1,61%, CX – 11,58±11,89%, SX – 9,88±2,84%.
- Fragmentálódottak: S -30,8,8±3,18%, D- 34,02±0,84%, SD – 31,25±10,75%, CX –2 sejtes állapotig fejlődtek: S – 19,12±3,37%, D- 11,34±2,13%, SD – 23,75±6,51%, CX- 12,63±7,86%, SX – 12,35±4,51%
- 4 sejtes embriók: S- 8,82±9,56 %, D - 17,53±2,29%, SD – 8,75±7,5%, CX – 20,00±3,14%, SX – 24,69±5,05%
- 8 sejtes embriók: S – 11,76±2,07%, D – 18,56±6,04%, SD – 8,75±4,05%, CX – 18,95±10,29%, SX – 12,35±3,58%. A következő szignifikáns különbségeket találtuk (P<0,05) : D szignifikánsan nagyobb, mint az S és az SD csoport; a CX szignifikánsan nagyobb Sx –nél és D –nél; az SX pedig szignifikánsan nagyobb, mint S és SD.
- Morula állapot: S – 11,76±5,93%, D – 9,28±2,55%, SD- 6,25±4,52%, CX – 12,63±8,24%, SX – 9,88±2,84%. Az eredmények nem szignifikánsak.
- Blasztociszta állapotot csak az S (2,94±2,56%), CX (3,16±4,12%) és az SX (8,64±8,07%) csoportokban tudtunk megfigyelni. A különbségek nem szignifikánsak.



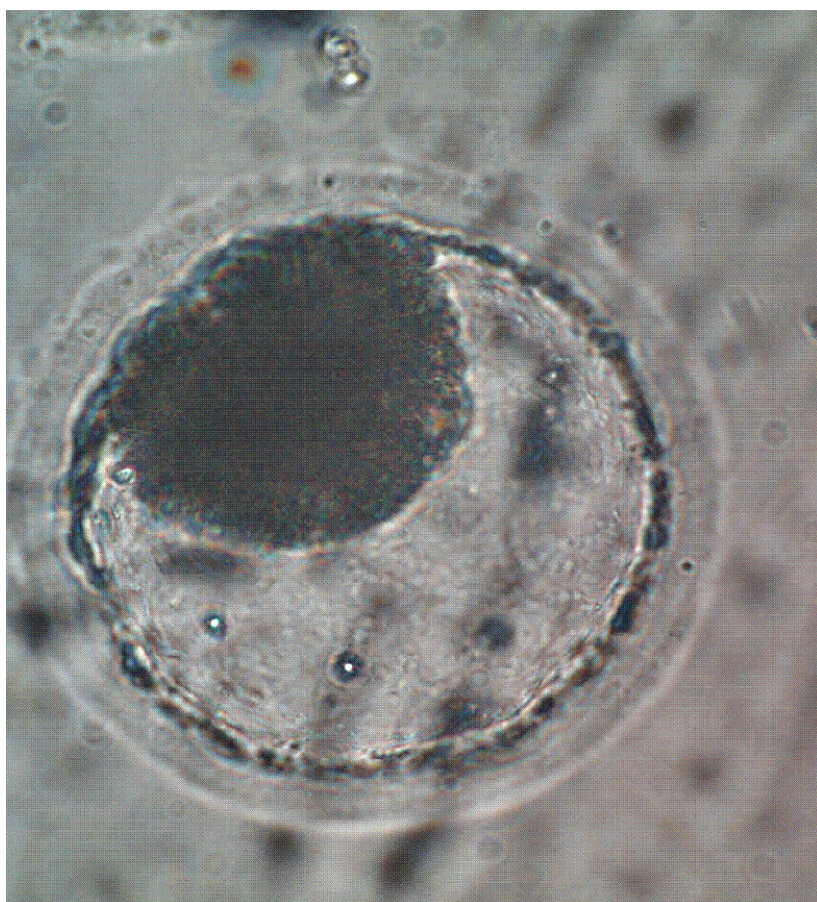
13. ábra. 2 sejtes embrió az SX csoportból (200x nagyítás)



14. ábra. 8 sejtes embrió az SD csoportból (200x nagyítás)



15. ábra. Morula embrió az SD csoportból (200x nagyítás)



16. ábra. Blasztociszta embrió a CX csoportból (200x nagyítás)

4. kísérletsorozat

Az Állattenyésztési Kutatóintézet munkatársainak segítségével 5 mangalica koca szuperoovuláltatása utáni lehetőség volt az in vivo előállított embriók műtéti kimosására

2. táblázat. Az embriómosás során a mangalica petefészkek állapota, valamint a kinyert embriók fejlettsége

Állatok	Petefészkek állapota		Kinyert embriók
1.	0 CL, 0 ciszta	3 CL	1 db, 4 sejtes embrió
2.	ciszta	ciszta	0
3.	24 CL	26 CL	2db 4 sejtes, 2 blasztociszta, 1 petesejt
4.	ciszta	ciszta, 3 CL	0
5.	13 CL	16 CL	5 petesejt, 5 db 4-8 sejtes, 6 morula

.

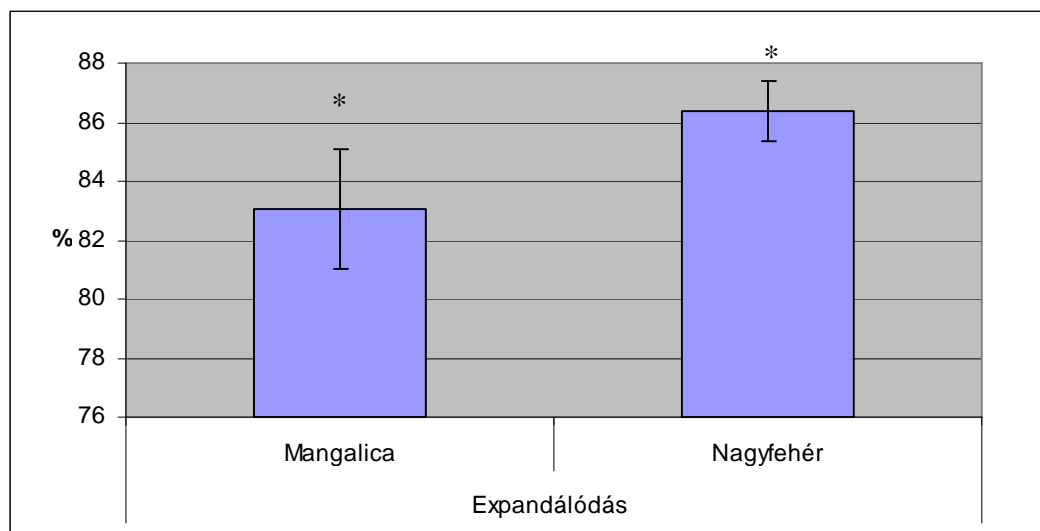
Az összes fejlődésnek indult embrió: 8 db 4-8 sejtes, 6 morula, illetve két blasztociszta embrió műtéti úton beültettünk egy recipiens anyába, mely visszaivarzott.

5. kísérletsorozat

Mangalica és nagy fehér petesejtek különböző módszerekkel történő vitrifikációja
Vitrifikációs eljárások:

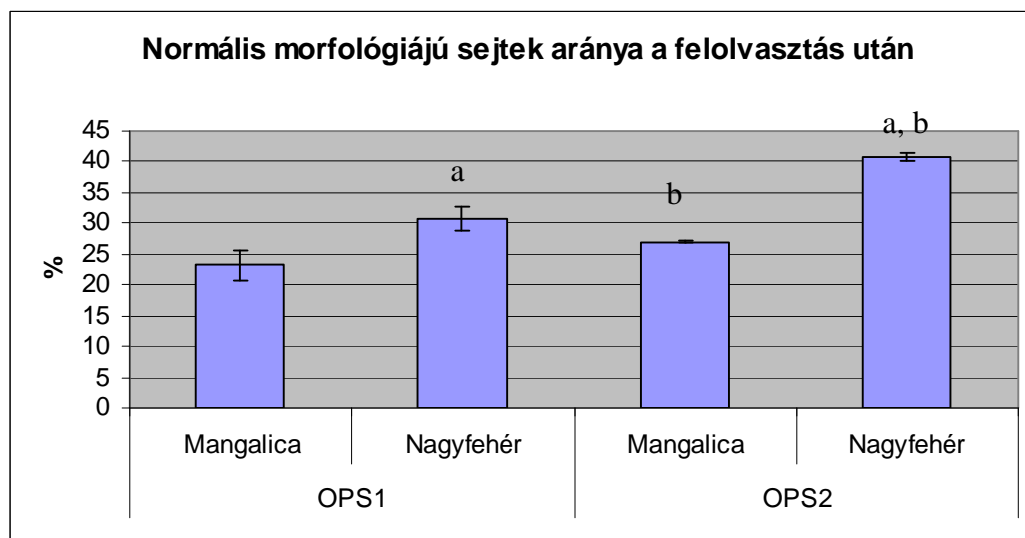
OPS 1 : Krioprotektív anyagok aránya: 3 M dimetil-szulfoxid, 3 M etilén-glikol.

OPS 2: A krioprotektív anyagok aránya: 6 M dimetil-szulfoxid, 6 M etilén-glikol



17. ábra. Expandálódási arány

A petesejtérés végére az expandálódási arány $83,1 \pm 2,1$, míg a nagy fehér esetében $86,4 \pm 1,1$ % volt, amely különbség szignifikáns $P < 0,05$ szignifikancia szinten.



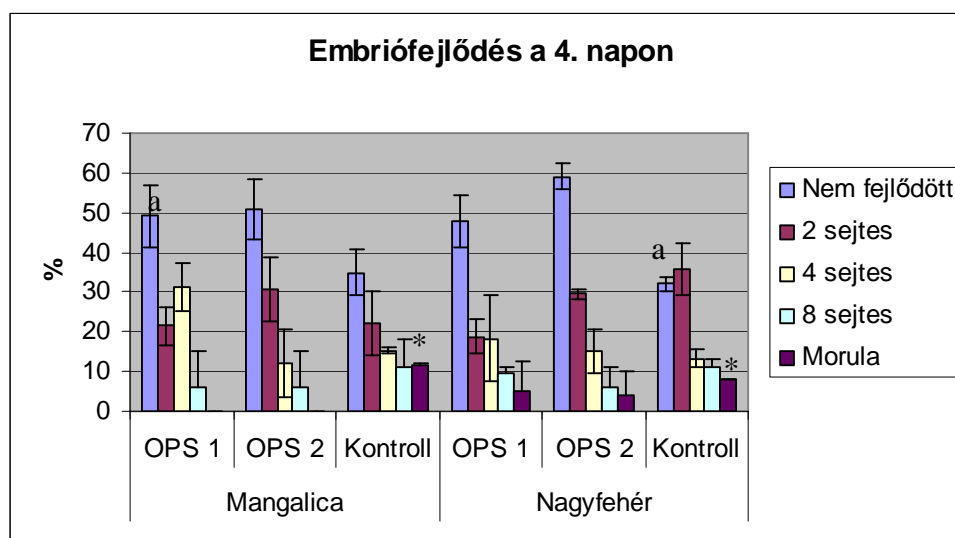
18. ábra. Felolvasztás után normális morfológiájú petesejtek -aránya

A két módszerrel vitrifikált petesejtek közül normális morfológiát mutatott az OPS1 eljárást követően a mangalica petesejtek $23,28 \pm 2,43$ %, ezzel összehasonlítva az OPS 2 eljárással $26,98 \pm 0,21$ %. A különbség nem szignifikáns.

A nagyfehér petesejtek esetében az OPS1 eljárást követő visszaolvasztás után a petesejtek $30,85 \pm 1,92$ % illetve az OPS2 eljárást követően $40,88 \pm 0,71$ %-a különbség szignifikáns $P < 0,05$ szignifikancia szinten.

A mangalica és nagyfehér petesejtek a vitrifikáció és visszaolvasztás folyamatát követően a sejtek normális morfológiájának tekintetében vizsgálva nagy eltérést mutattak. A különbségek OPS 1 eljárást követően nem szignifikánsak, azonban az OPS 2 eljárást követően a mangalica ($26,98 \pm 0,21$ %) és a nagyfehér ($40,88 \pm 0,71$ %) petesejtek közötti különbségek $P < 0,05$ szinten szignifikánsak.

A normál morfológiai arányt vizsgálva, ez igazolja, hogy a különböző fajták esetében szükség van a vitrifikációs módszerek finomítására



19. ábra. In vitro embrió-fejlődés a 4. napon

Az összehasonlított két OPS eljárás embriófejlődésre gyakorolt hatását vizsgálva megállapítható, hogy a mangalica esetében az in vitro petesejt maturáltatást követő vitrifikáltatás visszaolvasztás utáni fertilizáció követő embriófejlődés megtorpan a 8 sejtes állapotban, ezt is az embrióknak csak $6,3 \pm 8,8\%$ érte el OPS1 és OPS2 esetében.

A nagy fehér embrióknál az OPS1 eljárást követően az embriók $5,3 \pm 7,5\%$ illetve az OPS eljárás után $4,2 \pm 5,9\%$ a morula állapotot elérte. A morulafejlődés a nagyfehér kontroll csoportban $7,9 \pm 0,3\%$ volt. A különbségek $P < 0,05$ szinten nem szignifikánsak.

A vitrifikáltatás nélküli in vitro embriófejlődést vizsgálva a mangalica embriók $11,37 \pm 0,56\%$, míg a nagy fehér embriók $7,87 \pm 0,25\%$ -a fejlődött morulává. A különbségek $P < 0,05$ szinten szignifikánsak.

Nagy fehér embrióknál OPS 1 esetén az embriók $9,62 \pm 1,29\%$ érte el, az OPS 2 eljárásnál pedig $6,15 \pm 4,77\%$ érte el a 8 sejtes állapotot. A különbségek nem szignifikánsak.

Mangalica embriók esetében OPS 1 eljárásnál $49,1 \pm 7,6\%$, OPS 2 –nél $50,8 \pm 7,6\%$, a kontroll csoportban pedig $34,9 \pm 5,8\%$ nem kezdte meg az embrionális fejlődést. A különbségek nem szignifikánsak.

Nagy fehér embrióknál ez az arány a következőképpen alakult: OPS1 - $48,1 \pm 6,5\%$, OPS2 – $59,1 \pm 3,1\%$, a kontroll csoportban pedig $32,1 \pm 0,8\%$. A különbségek OPS 1 és a kontroll csoport között $P < 0,05$ szinten szignifikánsak

Összefoglalás:

Első kísérletsorozat

Az idegi növekedési faktor (NGF) 1 ng/ml koncentrációjának hatását vizsgálva a sejtmagi érése megállapítható, hogy szignifikáns különbség volt tapasztalható 30 óra petesejt kultiválás után az NGF és kontroll csoport között. Erre az időpontra szignifikánsan több petesejt érte el az érett M-II. állapotot az NGF csoportban, mint a kontrollban ($32,0 \pm 9,6\%$ és $5,7 \pm 5,7\%$). A maturáltatás alatti NGF kezelés nem volt hatással az embriók osztódására. Az osztódott embriók közel fele 2 sejtes állapotban rekedt, attól függetlenül, hogy a kultivációs médium tartalmazott-e NGF-et vagy nem. Az NGF csoportban az embriók egy nagyon kis mennyisége elérte a blasztocisza állapotot, míg a kontroll csoportban ilyen mértékű embrió fejlődés nem volt tapasztalható

Második kísérletsorozat:

Vizsgáltuk a kumulusz réteggel körülvett illetve kumulusz sejtek nélküli éretlen petesejtek túlélő képességét a vitrifikációt és visszaolvasztást követően. A vitrifikáció után szignifikánsan kevesebb petesejt rendelkezett normál morfológiával (intakt plazmamembrán) mind a kumulusz sejt nélküli, mind a kumulusz sejtes csoportban ($4,7\%$ és $8,5\%$) mind a fagyasztás nélküli kontrollnál ($95,0\%$ és $92,0\%$). A vitrifikációs eljárás során a petesejtek nagy része degradálódott. Megállapítható azonban, hogy a kumulusszal körülvett petesejtekben nagyobb a normál morfológiájú petesejtek aránya, mint a csupasz petesejtek esetében. A maturáció illetve a vitrifikáció sorrendje és a sejtek morfológiai állapota között nem találtunk összefüggést.

Harmadik kísérletsorozat:

A sertés petesejtek kémiai aktiválhatóságát vizsgáltuk olyan módon, hogy egyrészt összehasonlítottuk a stroncium-klorid (S) sertés petesejt aktiváló és partenogenetikus fejlődést elősegítő képességét a cikloheximiddel (CX) és a 6-dimetilaminopurinnal (D). Megállapítható hogy, minden csoportban a petesejtek több, mint 45% -a aktiválódott. A CX csoport aktiválási

rátája ($57,3 \pm 4,2$) a $P < 0,05$ szignifikancia szinten magasabb volt, mint a D ($48,1 \pm 3,4$) csoporté.

Vizsgáltuk, hogy a két kezelés kombinációja milyen hatással van az aktivációra és az embriófejlődésre. Az (S) és (SX) csoportban a petesejtek több, mint 50%-a aktiválódott ($53,3 \pm 5,4$ illetve $54,3 \pm 7,3$). Az SD csoportban az aktivációs ráta $49,1 \pm 1,9$ volt. A blasztocisza képződési arány SCX csoportban a $P < 0,05$ szignifikancia szinten magasabb volt, mint a kontrollé ($8,6 \pm 8,1\%$; $0,00 \pm 0,00\%$). Azonban a legtöbb embrió megállt a fejlődésben a 2 vagy 4 sejtes állapotban. Ez valószínű a 4 sejtes sertés embrió érzékenységének köszönhető, mivel az anyai genom irányítását ezután az állapot után kell átvenni az embrionális genomnak.

Az eredményeink azt mutatják, hogy az in vitro érlelt petesejtek aktiválhatók cikloheximiddel, 6-dimetilaminopurinnal és stronciumkloriddal.

Negyedik kísérletsorozat:

Az Állattenyésztési Kutatóintézet munkatársainak segítségével 5 mangalica koca szuperovuláltatása után, az in vivo előállított embriók műtéti kimosását követően az összes fejlődésnek indult embrió műtéti úton beültettünk egy recipiens anyába, mely visszaivarzott.

Ötödik kísérletsorozat:

A magyar nagy fehér és mangalica petesejtek különböző módszerekkel történő vitrifikációs hűtését követően vizsgálva a sejtek normális morfológiájának tekintetében nagy eltérést mutattak. A különbségek OPS 1 eljárást követően nem szignifikánsak, azonban az OPS 2 eljárást követően a mangalica ($26,9 \pm 0,2\%$) és a nagy fehér ($40,8 \pm 0,7\%$) petesejtek közötti különbségek $P < 0,05$ szinten szignifikánsak.

A visszaolvasztást követő fertilizáció utáni embriófejlődést összehasonlítva megállapítható, hogy a mangalica esetében az embriófejlődés megtorpant a 8 sejtes állapotban, ezt is az embrióknak csak $6,3 \pm 8,8\%$ érte el OPS1 és OPS2 esetében.

A nagy fehér embrióknál az OPS1 eljárást követően az embriók $5,3 \pm 7,5\%$ illetve az OPS eljárás után $4,2 \pm 5,9\%$ a morula állapotot elérte. A morula fejlődés a nagy fehér és kontroll csoportban $7,9 \pm 0,3\%$ volt. A különbségek $P < 0,05$ szinten nem szignifikánsak.

Az eredmények publikálása folyamatban van

1. **E. Varga – Á. Bali Papp (2006)** Parthenogenetic activation of cumulus free oocytes using chemical agents. Animal Reproduction Science (submitted) (IF:1,681)
2. **E. Varga – J.C. Gardon – Á. Bali Papp (2006):** Effect of open pulled straw (OPS) vitrification on the fertilization ability and developmental competence of porcine oocytes. Acta Veterinaria Hungarica (accepted) (IF: 0,535)
3. **E. Varga – C. Matas – S. Ruiz - Á. Bali Papp (2006)** Sertés petesejtek vitrifikálása nyitott végű műszalma (OPS) eljárással. Állattenyésztés és Takarmányozás (elfogadva)

Az 5. kísérletsorozat eredményeit „How can influence different vitrification methods the in vitro maturation and embryo developments of different breeds of swine” címmel hamarosan beküldjük az Animal Reproduction Science folyóiratba.